

明細書

二枚の基板を重ね合わせてバイオアッセイ用基板を製造する方法及びバイオアッセイ用基板

5

技術分野

本発明は、DNAチップその他のバイオアッセイ用基板に係わる技術に関する。より詳しくは、電極を有する二枚の基板を位置合わせして重ね合わせることによって対向電極が形成されたバイオアッセイ用基板並びに該バイオアッセイ用基板の製造方法に関する。

10

背景技術

本発明に関する主たる背景技術を説明する。まず、第一の背景技術（従来技術）は、マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ（以下、「DNAチップ」と総称。）と呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板に関する技術である（例えば、特表平4-505763号公報、特表平10-503841号公報参照）。

15

このDNAチップ技術は、ガラス基板やシリコン基板上に多種・多数のDNAオリゴ鎖やcDNA（complementary DNA）等が集積されていることから、ハイブリダイゼーション等の分子間相互反応の網羅的解析が可能となる点が特徴とされている。このためDNAチップは、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等に利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用さ

20

25

れ始めている。DNAチップ以外にも、基板上にタンパク質を固定したプロテインチップや種々の物質間の相互作用を解析するためのバイオセンサーチップなども開発されている。

第二の背景技術は、液相中において荷電して存在する物質に対する電界の作用に係わる技術である。具体的には、ヌクレオチド鎖（核酸分子）は、液相中において電界の作用を受けると伸長又は移動することが知られており、その原理は、ヌクレオチド鎖の骨格をなすリン酸イオン（陰電荷）とその周辺にある水がイオン化した水素原子（陽電荷）とによってイオン雲を作っていると考えられ、これらの陰電荷及び陽電荷により生じる分極ベクトル（双極子）が、高周波高電圧の印加により全体として一方向を向き、その結果としてヌクレオチド鎖が伸長し、加えて、電気力線が一部に集中する不均一電界が印加された場合、ヌクレオチド鎖は電気力線が集中する部位に向かって移動する(Seiichi Suzuki, Takeshi Yamanashi, Shin-ichi Tazawa, Osamu Kurosawa and Masao Washizu: "Quantitative analysis on electrostatic orientation of DNA in stationary AC electric field using fluorescence anisotropy", IEEE Transaction on Industrial Applications, Vol. 34, No. 1, P75-83 (1998) 参照)。この移動は「誘電泳動」と呼ばれる。例えば、数十から数百 μm のギャップを持つ微細電極中にDNA溶液をおき、ここに 1 MV/m 、 1 MHz 程度の高周波電界を印加すると、ランダムコイル状で存在するDNAに誘電分極が生じ、その結果、DNA分子は電界と平行に直線状に引き伸ばされる。そして、「誘電泳動」と呼ばれる電気力学的効果によって、分極したDNAは自発的に電極端へと引き寄せられ、電極エッジにその一端を接した形で固定されることが知

られている（鷲津正夫、「見ながら行うDNAハンドリング」、可視化情報 Vol. 20 No. 76（2000年1月）参照）。

上記したDNAチップ技術は、物質間の相互作用の場を提供する反応領域を基板に予め設定しておき、この反応領域中にDNA
5 プローブ等の検出用ヌクレオチド鎖を固定しておくことによって、この検出用ヌクレオチド鎖と相補的な標的ヌクレオチド鎖との間の相互作用であるハイブリダイゼーションを解析する技術であるが、ハイブリダイゼーションの効率が悪いため、同反応に
10 長時間を要する点や、擬陽性や偽陰性が発生するため検出精度が低い点などが重要な技術的課題となっている。

このDNAチップ技術を実施する場合において、前記反応領域中にその末端部位が固定されて存在する検出用ヌクレオチド鎖を伸長状態に調整することができれば、ランダムコイル状の分子
15 高次構造に起因する立体障害や前記検出用ヌクレオチド鎖と周辺表面との干渉（例えば、付着や接触）による障害を排除することが可能となり、その結果、ハイブリダイゼーションの効率が向上すると考えられる。

そこで、本発明は、反応領域に対向電極を設けておき、これに
20 所定の電界を印加することによって、物質の高次構造調整、移動、固定化等を自在に行うことができるバイオアッセイ用基板の提供並びにその製造方法を提供することを主な目的とする。

発明の開示

本発明で提供するバイオアッセイ用基板の基本構成は、物質間
25 の相互作用の場を提供する反応領域と、該反応領域に臨むように配置された第1電極と、を少なくとも備える「第1基板」と、該

第 1 電極に対向するように形成された第 2 電極を少なくとも備える「第 2 基板」と、が重ね合わされた形態のものであり、また、第 1 電極と第 2 電極の対向軸が反応領域の底面に対して垂直となるものである。

5 そして、第 1 基板側の第 1 電極部位に光源を設け、第 2 基板側の第 2 電極部位に受光部を設けた構成、あるいは、前記第 1 電極部位に受光部が設けられ、前記第 2 電極部位に光源が設けられた構成のバイオアッセイ用基板も提供できる。

10 次に、本発明では、物質間の相互作用の場を提供する反応領域と、該反応領域に臨むように設けられた第 1 電極と、を少なくとも備える検出部が設けられた「第 1 基板」と、前記第 1 電極との間で前記反応領域に電界印加可能な第 2 電極が少なくとも設けられた「第 2 基板」と、を用いて、これら二枚の基板を、前記第 1 電極と前記第 2 電極とが対向するように重ね合わせるバイオ
15 アッセイ用基板の製造方法を提供する。

 また、複数個の前記検出部が配列された「第 1 基板」と、複数個一組の前記検出部のそれぞれに配置されている前記第 1 電極との間で対向電極の関係を形成する共通第 2 電極が設けられた「第 2 基板」と、を重ね合わせる製造方法を提供する。この「共
20 通第 2 電極」は、複数の第 1 電極との間で対向電極を形成できるので、電極構成を簡易化できる。

 さらに、円盤状の形態をなす二枚の基板を重ね合わせる場合には、複数の前記検出部が基板中央から放射状列、同心円状列、スパイラル状列のいずれかの形状をなして配設された円盤状の「第
25 1 基板」と、一つの前記形状列に属する一部又は全部の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第 2 電極が形成された「第 2 基

板」と、を重ね合わせる製造方法も提供する。

ここで、本発明で使用する主たる技術用語の定義付けを行う。まず、本発明において用いられる「相互作用」は、物質間の非共有結合、共有結合、水素結合を含む化学的結合あるいは解離を広く意味し、例えば、核酸（ヌクレオチド鎖）間の相補結合であるハイブリダイゼーションを含む。

次に、「対向電極」は、電極面が向かい合った状態で配置される少なくとも一对の電極を意味する。「対向軸」とは、対向する二つの電極面の中心同士を結ぶ直線によって形成される軸を意味する。

ここで、本発明において「核酸」とは、プリンまたはピリミジン塩基と糖がグリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステルの重合体を意味し、DNAプローブを含むオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プリンヌクレオチドとピリミジンヌクレオチドが重合したDNA（全長あるいはその断片）、逆転写により得られるcDNA（cDNAプローブ）、RNA、ポリアミドヌクレオチド誘導体（PNA）等を広く含む。

「ハイブリダイゼーション」は、相補的な塩基配列構造を備えるヌクレオチド鎖間の相補鎖（二本鎖）形成反応を意味する。「ミスハイブリダイゼーション」は、正規ではない前記相補鎖形成反応を意味し、本発明では、しばしば「ミスハイブリ」と略称する。

「反応領域」は、ハイブリダイゼーションその他の相互作用の反応場を提供できる領域であり、例えば、液相やゲルなどを貯留できるウェル形状を有する反応場を挙げることができる。この反応領域で行われる相互作用は、本発明の目的や効果に沿う限りに

において、狭く限定されない。例えば、一本鎖核酸間の相互反応、即ちハイブリダイゼーションに加え、検出用核酸から所望の二本鎖核酸を形成し、該二本鎖核酸とペプチド（又はタンパク質）の相互反応、酵素応答反応その他の分子間相互反応も行わせることも可能である。例えば、前記二本鎖核酸を用いる場合は、転写因子であるホルモンレセプター等のレセプター分子と応答配列 DNA 部分の結合等を分析することができる。

「立体障害（steric hindrance）」は、分子内の反応中心等の近傍に嵩高い置換基の存在や反応分子の姿勢や立体構造（高次構造）によって、反応相手の分子の接近が困難になることによって、所望の反応（本発明では、ハイブリダイゼーション）が起こりにくくなる現象を意味する。

「誘電泳動」は、電界が一様でない場において、分子が電界の強い方へ駆動する現象であり、交流電圧をかけた場合も、かけた電圧の極性の反転につれて分極の極性も反転するので、直流の場合と同様に駆動効果が得られる（監修・林 輝、「マイクロマシンと材料技術（シーエムシー発行）」、P 37～P 46・第5章・細胞およびDNAのマニピュレーション参照）。

「バイオアッセイ用基板」は、生物化学的、あるいは分子生物学的な分析や解析を目的に使用される情報集積基板を意味し、いわゆるDNAチップを含む。

本発明によれば、現在普及している確立された光ディスクの製造技術を用いて、対向電極を備えるバイオアッセイ用基板を低コストで、かつ容易に製造することができる。バイオアッセイ用基板の対向電極に所定の電界を所定のタイミングで印加することによって、前記反応領域中に存在する核酸等の物質の高次構造調

整、電界に沿って物質の移動、物質の末端部位の電極表面への固定化等を自在に行うことができる。

図面の簡単な説明

5 第1図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の基本構成の一例と該バイオアッセイ用基板(1)の基本的な製造方法を説明するための図である。

第2図は、第1図中のI-I線矢視断面図(重ね合わされた状態)である。

10 第3図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の第二の基本構成の一例と該バイオアッセイ用基板(2)の基本的な製造方法を説明するための図である。

第4図は、第3図中のII-II線矢視断面図(重ね合わされた状態)である。

15 第5図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の第三の基本構成を説明する図であって、該バイオアッセイ用基板(3)を構成する円盤状の第1基板(31)の構成を示す図である。

第6図は、同バイオアッセイ用基板(3)を構成する円盤状の第2基板(32)の構成を示す図である。

20 第7図は、第1基板(31)と第2基板(32)とが重ね合わされた状態の同バイオアッセイ用基板(3)の断面図である。

第8図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板で採用可能な円盤状の第1基板の変形例(41)の構成を示す図である。

25 第9図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板に対向電極を形成するとき採用できる他の実施形態を示す図である。

第10図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板(1)の発展

形態の例を説明するための図である。

第 1 1 図は、バイオアッセイ用基板（1）の要部外観斜視図である。

第 1 2 図は、同要部の縦断面図であり、標的 DNA（T）が電
5 界により伸長されながら移動している様子を模式的に示す図である。

第 1 3 図は、同要部の縦断面図であり、DNA プローブ（D）
と標的 DNA（T）との間でのハイブリダイゼーションが進行し
て二本鎖 DNA が形成されている状態を模式的にしている図で
10 ある。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明に係るバイオアッセイ用基板の製造方法の好適な
実施方法及び同バイオアッセイ用基板の好適な実施形態につい
15 て、添付図面を参照しながら説明する。

まず、第 1 図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の基本構
成の一例と該バイオアッセイ用基板の基本的な製造方法を説明
するための図であり、第 2 図は、第 1 図中の I - I 線矢視断面図
である。これら第 1 図、第 2 図に示された符号 1 は、本発明に係
20 るバイオアッセイ用基板を表している。

このバイオアッセイ用基板 1 は、符号 1 1 で示す下側の第 1 基
板と、符号 1 2 で示す上側の第 2 基板と、から構成されている。
バイオアッセイ用基板 1 は、これら二枚の基板 1 1 と 1 2 とを正
確に位置合わせして重ね合わせることによって製造される。

25 第 1 基板 1 1 や第 2 基板 1 2 は、ガラスや合成樹脂で形成され
ており、少なくとも、ハイブリダイゼーションなどの相互作用を

検出するために用いる励起光が照射される側の基板は、該励起光の所定波長域で透明な部材で形成するのが望ましい。本実施形態では、第1基板11が透明樹脂で形成されている。

下側の第1基板11の所定位置（例えば、中央位置）には、少なくとも一つの検出部Xが設けられている。この検出部Xには、上方に開口する所定容積のウエル（凹部）である反応領域Rと、この反応領域Rの底面中央に配置された、金やアルミニウム等の金属や光透過性のITO（インジウムスズオキサイド）などの導電性材料から形成された第1電極E₁₁と、が設けられている。

反応領域Rは、相互作用の場となる溶液を貯留したり、ゲルなどを保持したりできる領域又は空間として機能する。この反応領域Rに設けられた第1電極E₁₁は、第2基板12が第1基板11上に正確に位置合わせされて重ね合わされたときに、前記第2基板12の所定位置に設けられた第2電極E₁₂との間で、反応領域Rの底面に対して垂直方向の対抗軸を備える対向電極を形成する。両電極E₁₁－E₁₂間に電圧が印加されたときに、反応領域R中の媒質に電界を形成する役割を果たす。なお、対向電極間の距離は、1μm～1mm程度である。

また、この第1電極E₁₁は、DNAプローブDに代表される検出用物質を固定化するための検出表面として機能させることも可能である。この場合において第1電極E₁₁は、予めDNAプローブD等の検出用物質の末端を固定化できる表面処理を施しておく。なお、前記第2電極E₁₂を固定化の検出表面として用いることも可能である。

検出用物質がDNAプローブDである場合を例に挙げると、そ

の固定方法としては、電極 E_{11} 表面と DNA プローブ D の末端がカップリング反応等の反応によって固定されるようにしても良い。例えば、ストレプトアビジンによって表面処理された電極表面の場合には、ピオチン化された DNA プローブ D 末端の固定
5 に適している。あるいは、チオール (SH) 基によって表面処理された電極表面の場合には、チオール基が末端に修飾された DNA プローブ D をジスルフィド結合 ($-S-S-$ 結合) により固定することに適している。

なお、第 1 基板 11 の第 1 電極 E_{11} や第 2 基板 12 の第 2 電
10 極 E_{12} の各表面は、 SiO_2 、 SiN 、 $SiOC$ 、 $SiOF$ 、 SiC 、 TiO_2 のいずれか一つから選択される材料によって形成した絶縁層 (図示せず。) で覆うことが望ましい (後述する他形態の検出部でも同様。以下説明割愛)。これは、反応領域 R 中に貯留される場合があるイオン溶液による電気化学的な反応を防
15 止するためである。

続いて、第 3 図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の第二の基本構成の一例と該バイオアッセイ用基板の基本的な製造方法を説明するための図であり、第 4 図は、第 3 図中の I I - I I 線矢視断面図である。

20 第 3 図、第 4 図において符号 2 で示されたバイオアッセイ用基板は、上記したバイオアッセイ用基板 1 の場合と同様に、二枚の基板が重ね合わされて製造される。即ち、符号 21 で示された第 1 基板と符号 22 で示された第 2 基板とが重ね合わされることにより製造される。

25 このバイオアッセイ用基板 2 を構成する下側の第 1 基板 21 には、計 5 個 (5 個に限定しない。) の検出部 X が所定間隔で並

設されており、これら各検出部 X の各反応領域 R のそれぞれの底面には第 1 電極 E_{21} が配置されている。一方の第 2 基板 22 には、該基板長手方向に延びる線状又は帯状の第 2 電極 E_{22} が設けられている。なお、前記第 1 電極 E_{21} は、図示されたような別個独立の電極とするのではなく、第 2 電極 E_{22} と同様に、線状又は帯状の一体の電極であってもよい。

線状又は帯状をなす第 2 電極 E_{22} は、第 1 基板 21 の上に第 2 基板 22 が重ね合わされたときに、すべての第 1 電極 E_{21} を相手にして対向する共通電極として機能する。即ち、スイッチ S をオンにすると、電源 V を介して、各反応領域 R 中の媒質に対して同時に電界が形成される構成となっている（第 4 図参照）。

続いて、第 5 図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の第三の基本構成を説明する図であって、該バイオアッセイ用基板を構成する円盤状の第 1 基板の構成を示す図である。第 6 図は、同バイオアッセイ用基板を構成する円盤状の第 2 基板の構成を示す図である。第 7 図は、第 1 基板と第 2 基板が重ね合わされた状態の同バイオアッセイ用基板の断面図である。

まず、第 5 図に示す円盤状の第 1 基板 31 は、その中心部に円形の孔 311 が形成されており、かつ該第 1 基板 31 の上面には放射状あるいは同心円状をなすように配設された計 8 列の検出部 X 群が設けられている。各検出部 X（の反応領域 R）には、第 1 電極 E_{31} がそれぞれ配置されている。この第 1 電極 E_{31} 群は、孔 311 の周囲に形成されたリング状の第 1 通電部 312 に接続状態で導出する配線 313 に接続されている。なお、第 1 通電部 312 は、孔 311 の周壁面に露出している。

第 6 図に示されている、前記第 1 基板 31 と同口径の円盤状の

第2基板32は、その中心部に前記孔311と同口径の孔321が形成されており、該第2基板32の下面には、放射状をなすように配設された線状又は帯状をなす計8条（8条に限定しない。）の共通電極 E_{32} が形成されている。各共通電極 E_{32} は、孔321の周囲に形成されたリング状の第2通電部322に接続されている。なお、第2通電部322は、孔321の周壁面に露出している。

これらの第1基板31と第2基板32とを正確に所定の位置決めを行い、公知の光ディスク貼り合わせ技術等を応用して重ね合わせし、バイオアッセイ用基板3を形成すると、第2基板32の各共通電極 E_{32} は、下側の第1電極 E_{31} の各列の真上に、反応領域Rを横断又は縦断するように正確に配置されることになる。これにより各共通電極 E_{32} と対向電極を形成する（第7図参照）。

このとき、第1通電部312と第2通電部322とは一体化し、第7図中に符号34で示されたような一つの通電部を形成することになる。この通電部34は、孔35に挿着される通電治具36と接触して通電され、これにより対向電極 $E_{31}-E_{32}$ に電圧が印加される。なお、通電の方法はこれに限定されず、対向電極 $E_{31}-E_{32}$ に電圧が印加できれば採用可能である。また、前記孔35には、バイオアッセイ用基板3を保持又は回転させるための図示しないチャッキング機構も挿入される。

第8図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板で採用可能な円盤状の第1基板の変形例の構成を示す図である。図示された変形例である第1基板41には、上方視スパイラル状に配列された多数の検出部X群が設けられている。なお、各検出部Xには、符号

E_{41} で示す第1電極が設けられている（第8図参照）。

第1基板41のような配列構成からなる検出部X群の場合でも、これと同軌道のスパイラル状に延設された共通第2電極を備える第2基板（図示せず。）を重ね合わせたり、あるいは前記検出部X群をスパイラル状で、かつ放射列状に配列しておくことによって、例えば、上記したような第2基板32などを重ね合わせたりすることで、対向電極を形成することができる。

第9図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板に対向電極を形成するために採用できる他の実施形態を示す図である。下側の第1基板には、検出部Xを横断（又は縦断）する給電配線（又は帯状の電極）H1を延設しておき、一方の上方側の第2基板には、検出部Xを縦断（又は横断）する給電配線（又は帯状の電極）H2を延設しておくようにする。このような構成では、給電配線（又は帯状の電極）H1と同H2が交差する領域Yにおいて、対向電極を簡単に形成することができる。

次に、第10図は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の発展形態の例を説明するための図である。この実施形態を既述したバイオアッセイ用基板1に適用した場合で説明する。

まず、対向電極を構成する一方の電極 E_{11} 又は（電極 E_{12} ）に微小サイズの光源（例えば、発光ダイオードや半導体レーザ）Pを設け、かつ第1基板11に光源Pと光ファイバで結ばれた導波路構造を設けておき、他方の電極 E_{12} （又は電極 E_{11} ）には、前記光源Pからの出射光により発生した蛍光（例えば、蛍光インターカーレータからの蛍光）を捕捉する受光部である光ディテクターQを一体化して設けておく。

この場合、各電極 E_{11} 又は電極 E_{12} は、ITOなどの透明な

導電体で形成しておけば、光源（例えば、発光ダイオードや半導体レーザ）Pや光ディテクターQを電極 E_{11} 、電極 E_{12} の内部や反応領域Rに臨んでいない面側に設けることができる。なお、第10図の符号Uは、光ディテクターQに接続する解析部を示している。

続いて、第11図～第13図を用いて、本発明に係るバイオアッセイ用基板をDNAチップとして用いる場合のバイオアッセイ方法の一例を説明する。なお、以下の前記方法に係わる説明は、既述した符号1のバイオアッセイ用基板を代表例として採用する。第11図は、バイオアッセイ用基板1の要部外観斜視図、第12図、第13図は、同要部の縦断面図である。

（検出用物質の伸長及び固定化）

DNAプローブDに代表される検出用物質を含むサンプル溶液を、開口状態にある反応領域Rに対して、図示しないインクジェットノズルやディスペンサー等を用いて所定容量滴下する。

その後、第1基板11に第2基板12を位置決めして正確に重ね合わせた後、スイッチSをオンにし、電源Vを介して、対向電極 E_{11} － E_{12} 間に高周波交流電界を印加する。なお、この際、対向電極 E_{11} － E_{12} の間に印加される前記電界の条件は、約 1×10^6 V/m、約1 MHzの高周波高電圧の電界が好適である

(Masao Washizu and Osamu Kurosawa: "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Transaction on Industrial Application Vol. 26, No. 26, p. 1165-1172 (1990) 参照)。

なお、反応領域Rに対するサンプル溶液の滴下は、第2基板12の反応領域Rに臨む部分に所定の孔を形成しておき（図示せ

ず)、この孔から滴下するようにしてもよい。このような構成では、サンプル溶液を滴下する場合において、その都度、第2基板12を第1基板11上から取りはずして反応領域Rを開口させる必要がなくなる。

5 ここで、反応領域Rに対して前記高周波交流電界が形成されると、この反応領域Rには、電極 E_{12} よりも狭小な表面面積に形成された電極 E_{11} （第11図参照）の表面付近あるいはこの電極 E_{11} のエッジ付近に電気力線が集中して、不均一電界が形成される。

10 この不均一電界の作用によって、前記反応領域R中にランダムに分散して存在している検出用物質であるDNAプローブDが前記不均一電界に沿った方向に伸長し、直鎖状の高次構造に調製されながら誘電泳動の作用で電極 E_{11} に向けて移動し、最終的には、検出用物質の末端部位が電極 E_{11} の表面に、特異的なカップリング反応等によって固定化される（第11図参照）。その後、反応領域Rの所定のバッファー溶液を投入して洗浄作業を行い、余剰のDNAプローブDを除去したり、乾燥させたりしてもよい。

20 なお、特に、検出用物質が固定化される検出表面として利用する第1電極 E_{11} の表面を、凹凸や突起のある粗面状に加工しておいてもよい。例えば、凹凸が島状になるようにパターンニング形成しておくことによって、電気力線が、第1電極 E_{11} の表面の凸部位（山状部位）に集中し易くなって、不均一電界がより形成され易くなり、また、DNAプローブDを整列固定化し易くなる。

25 第1電極 E_{11} の粗面形態は限定されない。また、電極表面を粗面加工する方法は、例えば、公知のスputタリング技術及びエッ

チング技術等を用いて実施することができるが、該方法も特に限定されない。

（標的物質 T の滴下及び伸長移動）

次に、固定化された前記 DNA プローブ D と相補的な塩基配列を有する標的 DNA（符号 T）を含むサンプル溶液を、第 2 基板 1 2 が取り外されて再び開口状態とされた反応領域 R に滴下し（又は第 2 基板 1 2 に設けられた図示しない孔から滴下し）、その後、スイッチ S をオンにし、電源 V を介して、対向電極 E_{11} - E_{12} 間に高周波交流電界を印加する。なお、この際、対向電極 E_{11} - E_{12} の間に印加される前記電界の条件は、約 1×10^6 V/m、約 1 MHz の高周波高電圧の電界が好適である（Masao Washizu and Osamu Kurosawa: "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Transaction on Industrial Application Vol.26, No.26, p.1165-1172 (1990) 参照）。
この電界印加によって、反応領域 R で生じた不均一電界中において、符号 T で示す標的 DNA を、誘電泳動の電気力学的効果によって、電界強度のより強い電極 E_{11} の方へ、伸長させながら移動（泳動）させることができる（第 1 2 図参照）。

その結果、符号 D で示す DNA プローブ D が予め固定された電極 E_{11} 表面上に符号 T で示す標的 DNA が集まって濃度が高まり、ハイブリダイゼーションが進行し易い環境が形成され、ハイブリダイゼーション時間を短縮させることができる。

加えて、DNA プローブ D を、不均一電界の作用により、第 1 電極 E_{11} 表面に伸長状態で整列固定化させることができるので、前記検出用物質のランダムコイル状の高次構造が原因となる立体障害によるハイブリダイゼーションの阻害やミスハイブリダ

イゼーションを減少させることが可能となる。このため、ハイブリダイゼーションの効率と精度を向上させることができる。

(ハイブリダイゼーション)

ハイブリダイゼーションの際は、一旦スイッチ S をオフにすることによって反応領域 R 中における電界をゼロの状態とし、専ら
5 自然なブラウン運動に委ねて行うようにする。第 13 図は、DNA プロブ D と符号 T で示す標的 DNA との間でのハイブリダイゼーションが進行して、その結果、二本鎖 DNA が形成されている状態が模式的に示されている。

10 なお、反応領域 R において、ハイブリダイゼーションによって形成された二本鎖 DNA には、予め符号 T で示された標的 DNA と一緒に反応領域 R に投入された蛍光インターカーレータ、あるいは、ハイブリダイゼーション後に反応領域 R に投入された蛍光
15 インターカーレータに対して、所定の励起光を照射すると蛍光を発するようになる。この蛍光強度を検出する光学的手段（分光手段）によって、ハイブリダイゼーションを検出することが可能となる。また、前記ハイブリダイゼーションの検出は、検出用物質である DNA プロブ D に標識された蛍光物質が発する蛍光を検出する方法で行うこともできる。なお、本発明において、当該
20 検出手段は特に限定されない。

産業上の利用可能性

本発明によれば、ハイブリダイゼーション等の相互作用の効率が良いので、該相互作用の時間も大幅に短縮することができ、かつ
25 正確な相互作用が進行し易い環境を形成できるので、擬陽性や偽陰性の発生を少なく抑えることができる。このため、相互作用

検出のためのアッセイ作業の効率に優れ、かつ検出精度が高いという特性を備えたDNAチップ等のバイオアッセイ用基板及びその製造方法に利用することができる。

請求の範囲

1. 液相中での物質間の相互作用の場を提供する反応領域と、
該反応領域に臨むように配置された第1電極と、を少なくとも備
5 える第1基板と、

該第1電極に対向するように形成された第2電極を少なくとも
備える第2基板と、が重ね合わされたことを特徴とするバイオア
ッセイ用基板。

2. 前記第1電極と前記第2電極の対向軸が、前記反応領域底
10 面に対して垂直であることを特徴とする請求の範囲第1項記載
のバイオアッセイ用基板。

3. 前記第1電極部位に光源が設けられ、前記第2電極部位に
受光部が設けられていることを特徴とする請求の範囲第1項記
載のバイオアッセイ用基板。

15 4. 前記第1電極部位に受光部が設けられ、前記第2電極部位
に光源が設けられていることを特徴とする請求の範囲第1項記
載のバイオアッセイ用基板。

5. 物質間の相互作用の場を提供する反応領域と、該反応領域
に臨むように設けられた第1電極と、を少なくとも備える検出部
20 が設けられた第1基板と、

前記第1電極との間で前記反応領域に電界印加可能な第2電
極が少なくとも設けられた第2基板と、を用いて、

これら二枚の基板を、前記第1電極と前記第2電極とが対向す
るように重ね合わせるバイオアッセイ用基板の製造方法。

25 6. 複数個の前記検出部が配列された前記第1基板と、複数個
一組の前記検出部のそれぞれに配置されている前記第1電極と

の間で対向電極の関係を形成する共通第 2 電極が設けられた前記第 2 基板と、を重ね合わせることを特徴とする請求の範囲第 5 項記載のバイオアッセイ用基板の製造方法。

7. 複数の前記検出部が基板中央から放射状列をなして配設された円盤状の前記第 1 基板と、一つの放射状列に属する一部又は全部の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第 2 電極が形成された前記第 2 基板と、を重ね合わせることを特徴とする請求の範囲第 5 項記載のバイオアッセイ用基板の製造方法。

8. 複数の前記検出部が同心円状列をなして配設された円盤状の前記第 1 基板と、一つの同心円状列に属する一部又は全部の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第 2 電極が形成された前記第 2 基板と、を重ね合わせることを特徴とする請求の範囲第 5 項記載のバイオアッセイ用基板の製造方法。

9. 複数の前記検出部がスパイラル状列をなして配設された円盤状の前記第 1 基板と、一つのスパイラル状列に属する一部又は全部の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第 2 電極が形成された前記第 2 基板と、を用いることを特徴とする請求の範囲第 5 項記載のバイオアッセイ用基板の製造方法。

10. 前記第 1 電極と前記第 2 電極の対向軸は、前記反応領域底面に対して垂直であることを特徴とする請求の範囲第 5 項記載のバイオアッセイ用基板の製造方法。

補正書の請求の範囲

[2005年1月6日(06.01.2005)国際事務局受理：出願当初の請求の
範囲1-4は補正された；新しい請求の範囲11-15が加えられた；
他の請求の範囲は変更なし。(2頁)]

1. (補正後) 液相中での物質間の相互作用の場を提供する反応
領域と、該反応領域に臨むように配置された第1電極と、を少な
5 くとも備える第1基板と、

該第1電極に対向するように形成された共通第2電極を少な
くとも備える第2基板と、が重ね合わされたことを特徴とするバイ
オアッセイ用基板。

2. (補正後) 前記第1電極と前記共通第2電極の対向軸が、前
10 記反応領域底面に対して垂直であることを特徴とする請求の範
囲第1項記載のバイオアッセイ用基板。

3. (補正後) 前記第1電極部位に光源が設けられ、前記共通第
2電極部位に受光部が設けられていることを特徴とする請求の
範囲第1項記載のバイオアッセイ用基板。

15 4. (補正後) 前記第1電極部位に受光部が設けられ、前記共通
第2電極部位に光源が設けられていることを特徴とする請求の
範囲第1項記載のバイオアッセイ用基板。

5. 物質間の相互作用の場を提供する反応領域と、該反応領域
に臨むように設けられた第1電極と、を少なくとも備える検出部
20 が設けられた第1基板と、

前記第1電極との間で前記反応領域に電界印加可能な第2電
極が少なくとも設けられた第2基板と、を用いて、

これら二枚の基板を、前記第1電極と前記第2電極とが対向す
るように重ね合わせるバイオアッセイ用基板の製造方法。

25 6. 複数個の前記検出部が配列された前記第1基板と、複数個
一組の前記検出部のそれぞれに配置されている前記第1電極と

1 1. (追加) 複数の検出部が配列された前記第 1 基板と、複
数個一組の前記検出部のそれぞれに配置されている前記第 1 電
極との間で対向電極の関係を形成する共通第 2 電極が設けられ
た前記第 2 基板と、が重ね合わされていることを特徴とする請求
5 の範囲第 1 項記載のバイオアッセイ用基板。

1 2. (追加) 複数の検出部が基板中央から放射状列をなして配
設された円盤状の前記第 1 基板と、一つの放射状列に属する一部
又は全部の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第 2 電極
が形成された前記第 2 基板と、が重ね合わされていることを特徴
10 とする請求の範囲第 1 項記載のバイオアッセイ用基板。

1 3. (追加) 複数の検出部が同心円状列をなして配設された円
盤状の前記第 1 基板と、一つの同心円状列に属する一部又は全部
の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第 2 電極が形成さ
れた前記第 2 基板と、が重ね合わされていることを特徴とする請
15 求の範囲第 1 項記載のバイオアッセイ用基板。

1 4. (追加) 複数の検出部がスパイラル状列をなして配設され
た円盤状の前記第 1 基板と、一つのスパイラル状列に属する一部
又は全部の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第 2 電極
が形成された前記第 2 基板と、が重ね合わされていることを特徴
20 とする請求の範囲第 1 項記載のバイオアッセイ用基板。

1 5. (追加) 前記第 1 電極および前記共通第 2 電極は、前記第
1 電極および前記共通第 2 電極の間に交流電界を生成させる電
極であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載のバイオアッ
セイ用基板。

1/13

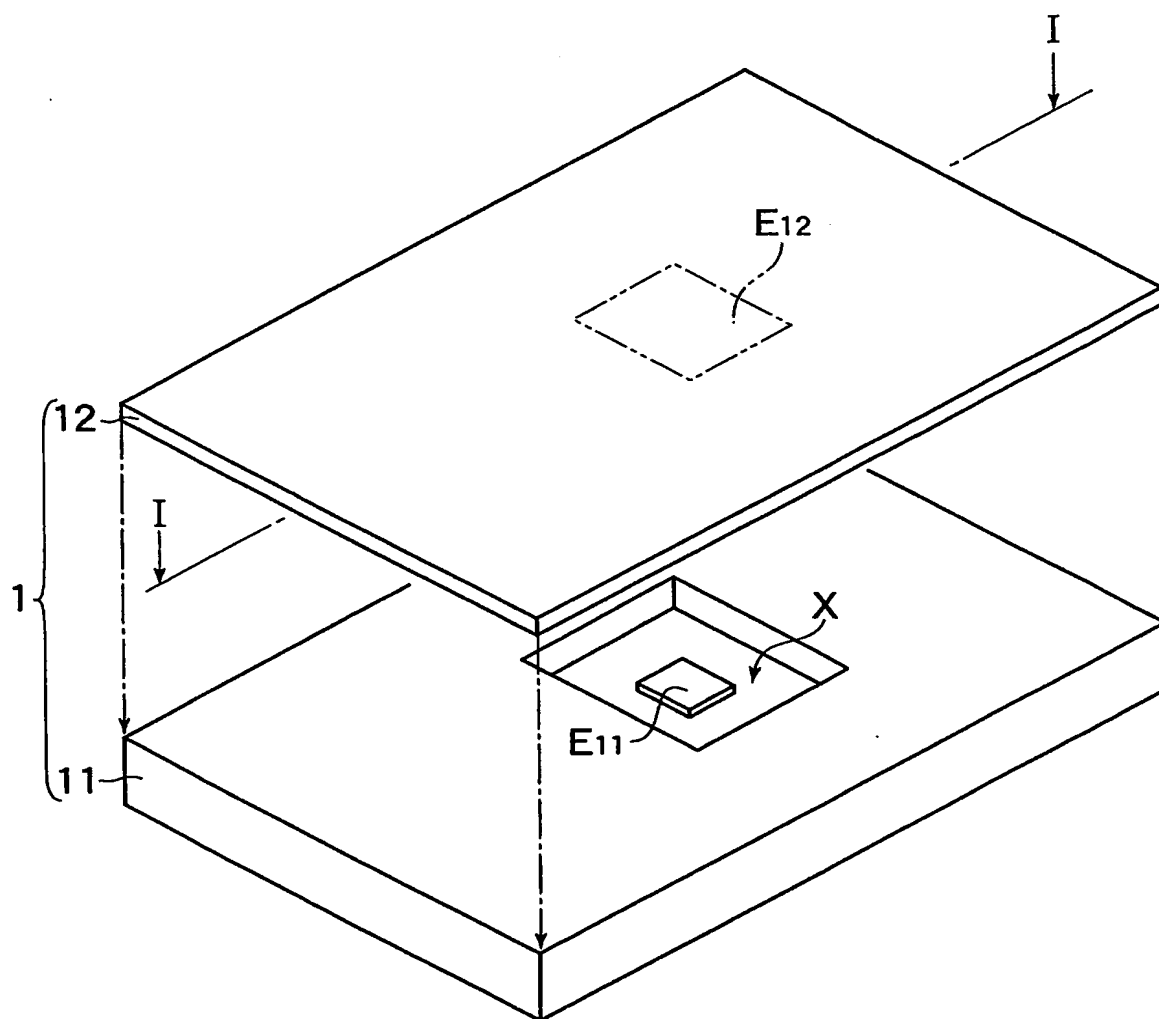


Fig.1

2/13

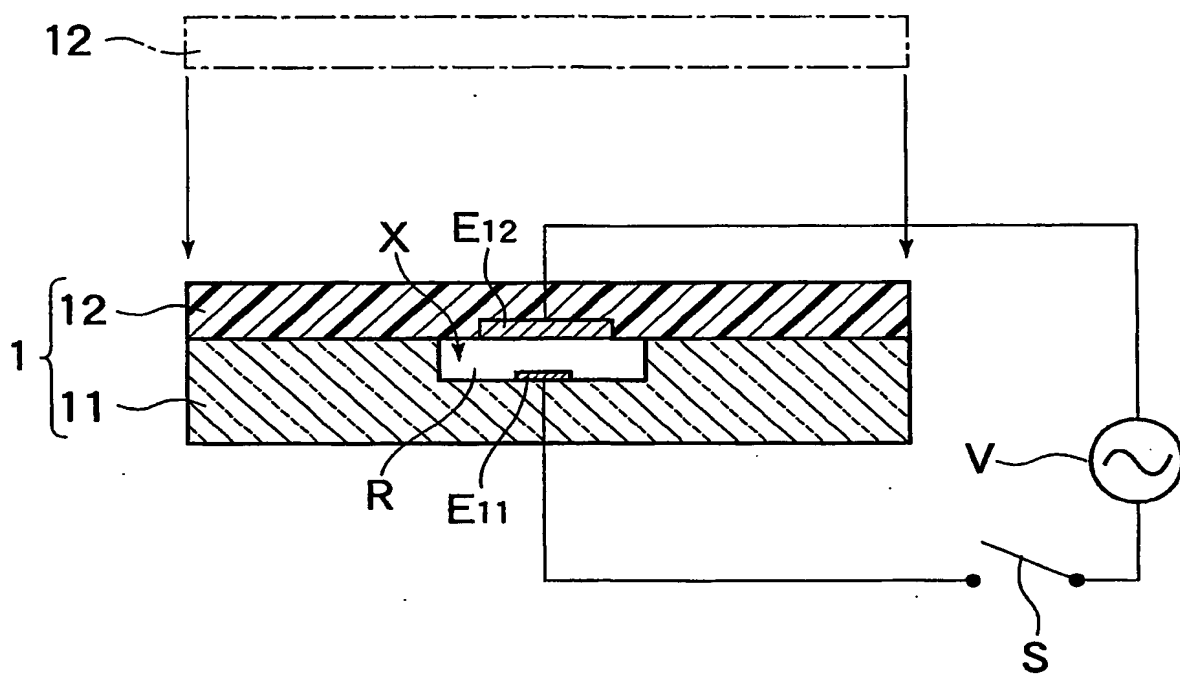


Fig.2

3/13

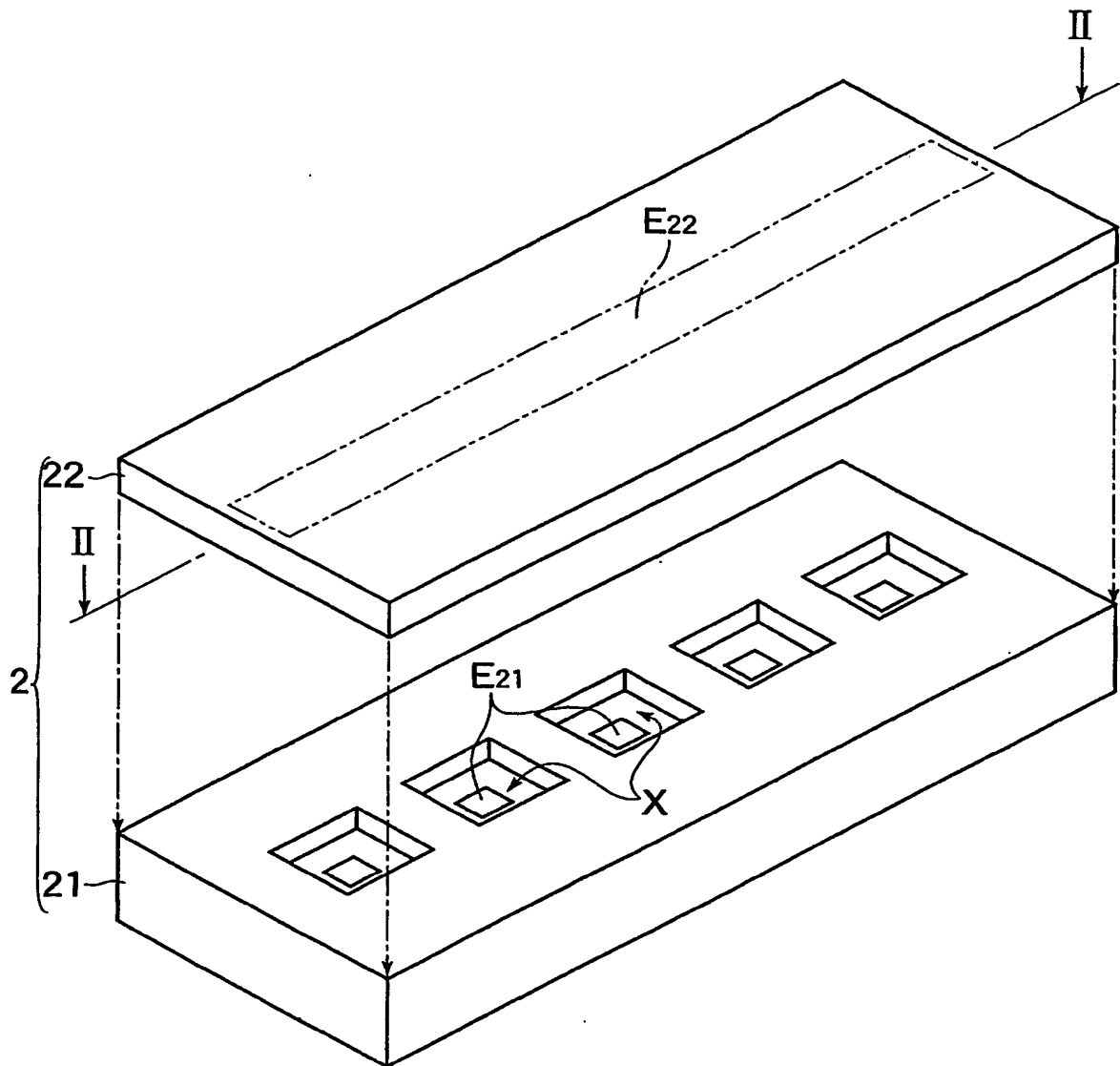


Fig.3

4/13

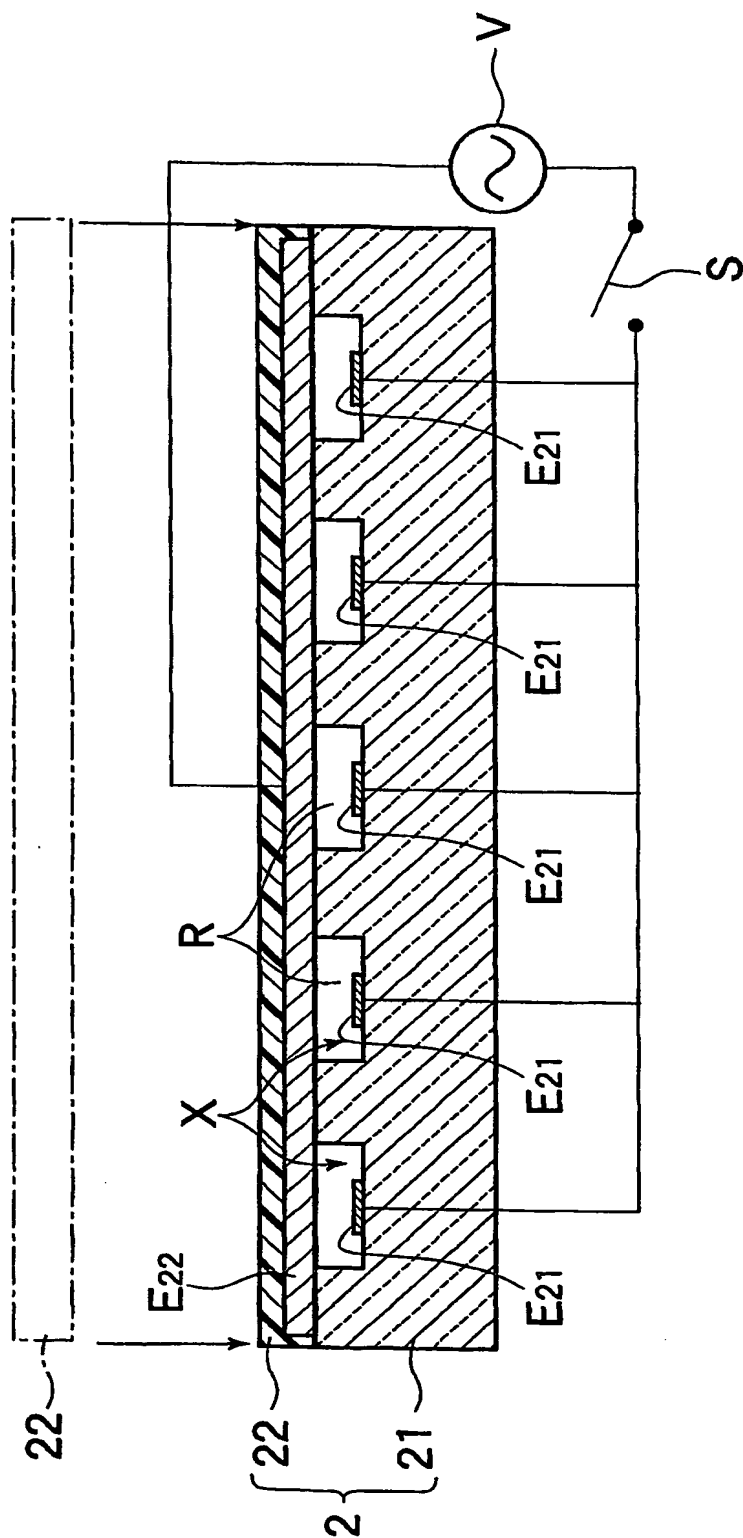


Fig.4

5/13

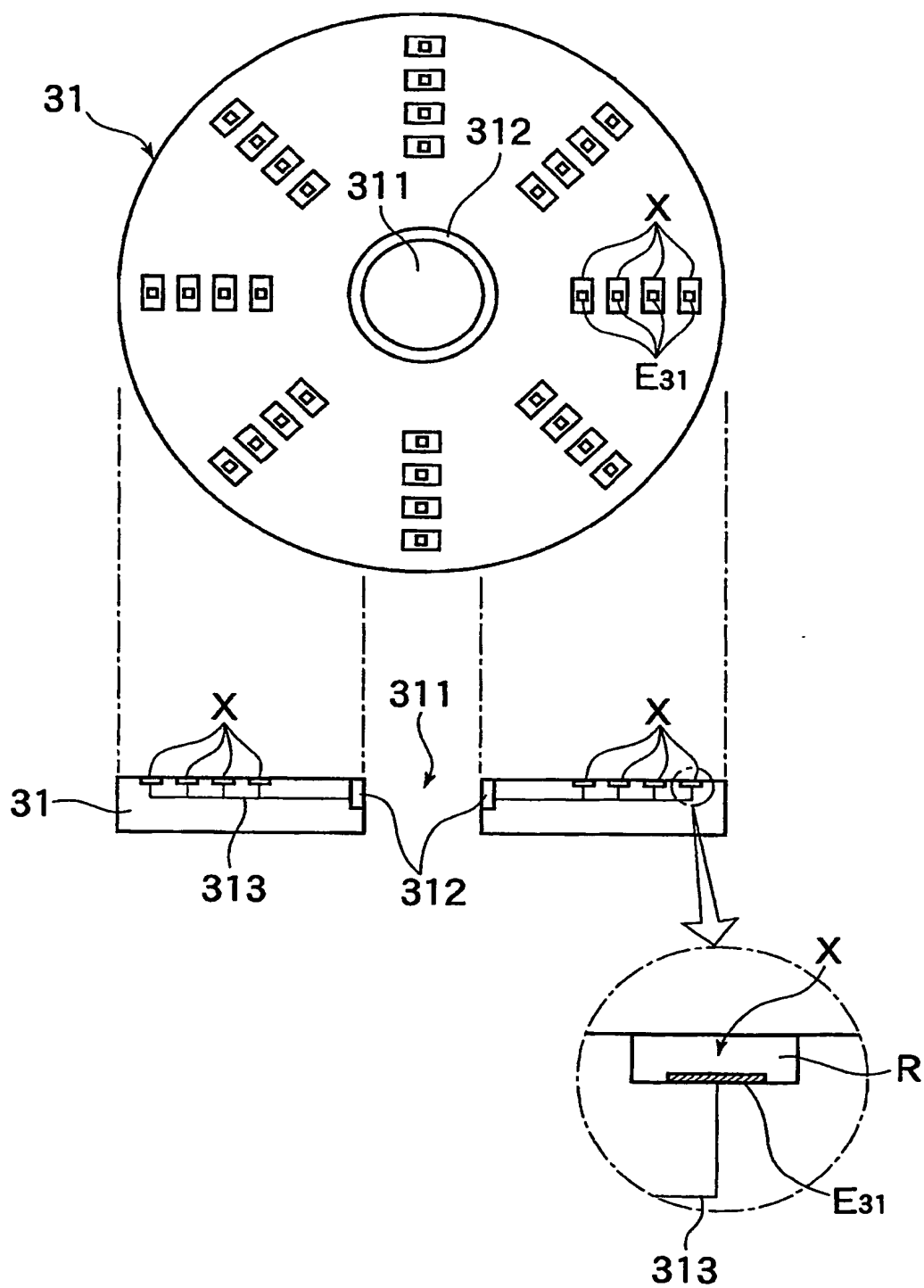


Fig.5

6/13

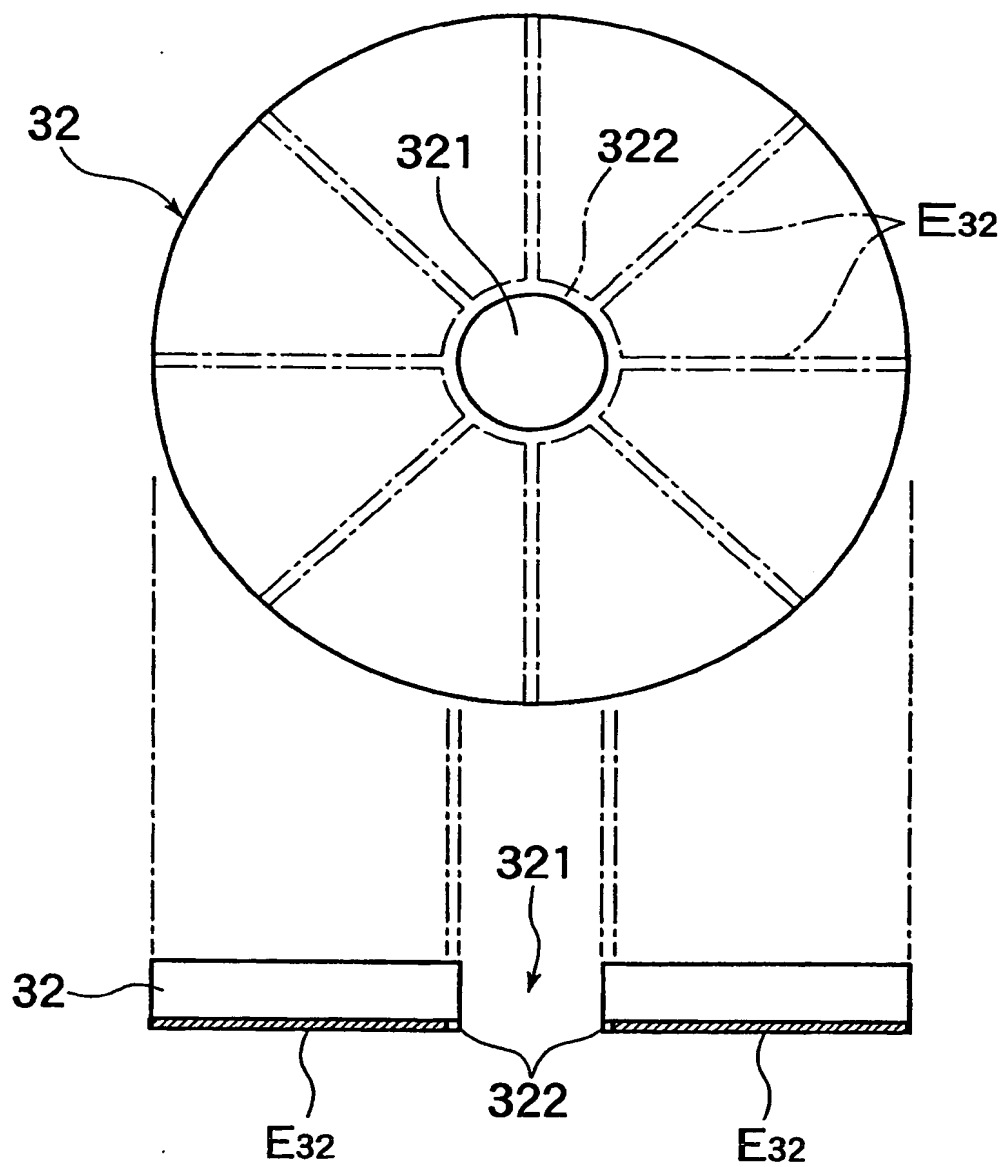


Fig.6

7/13

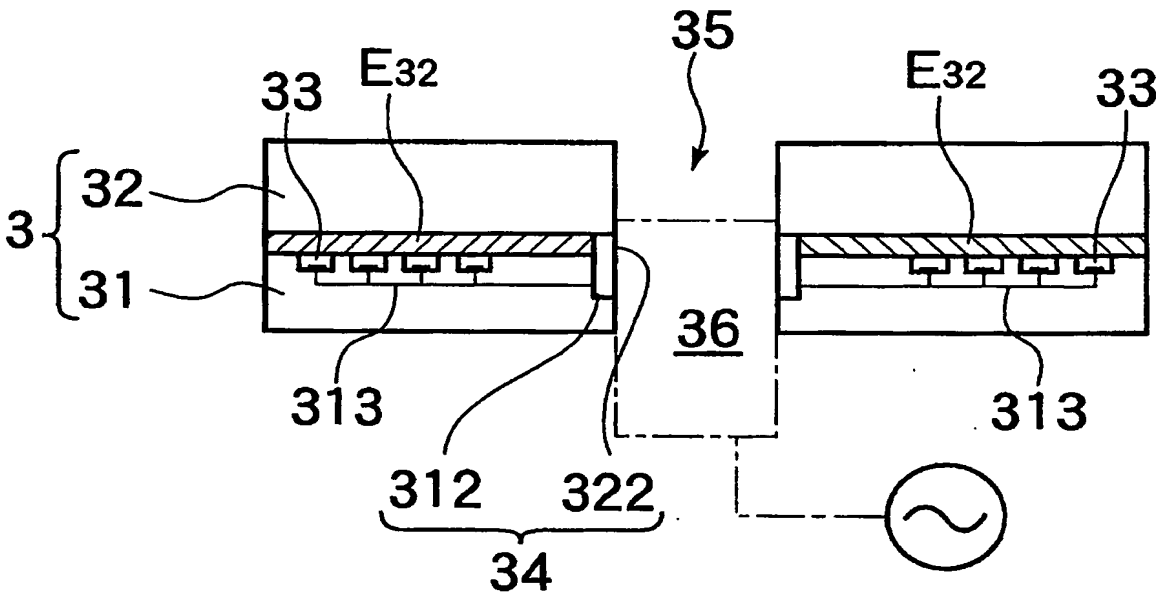


Fig.7

8/13

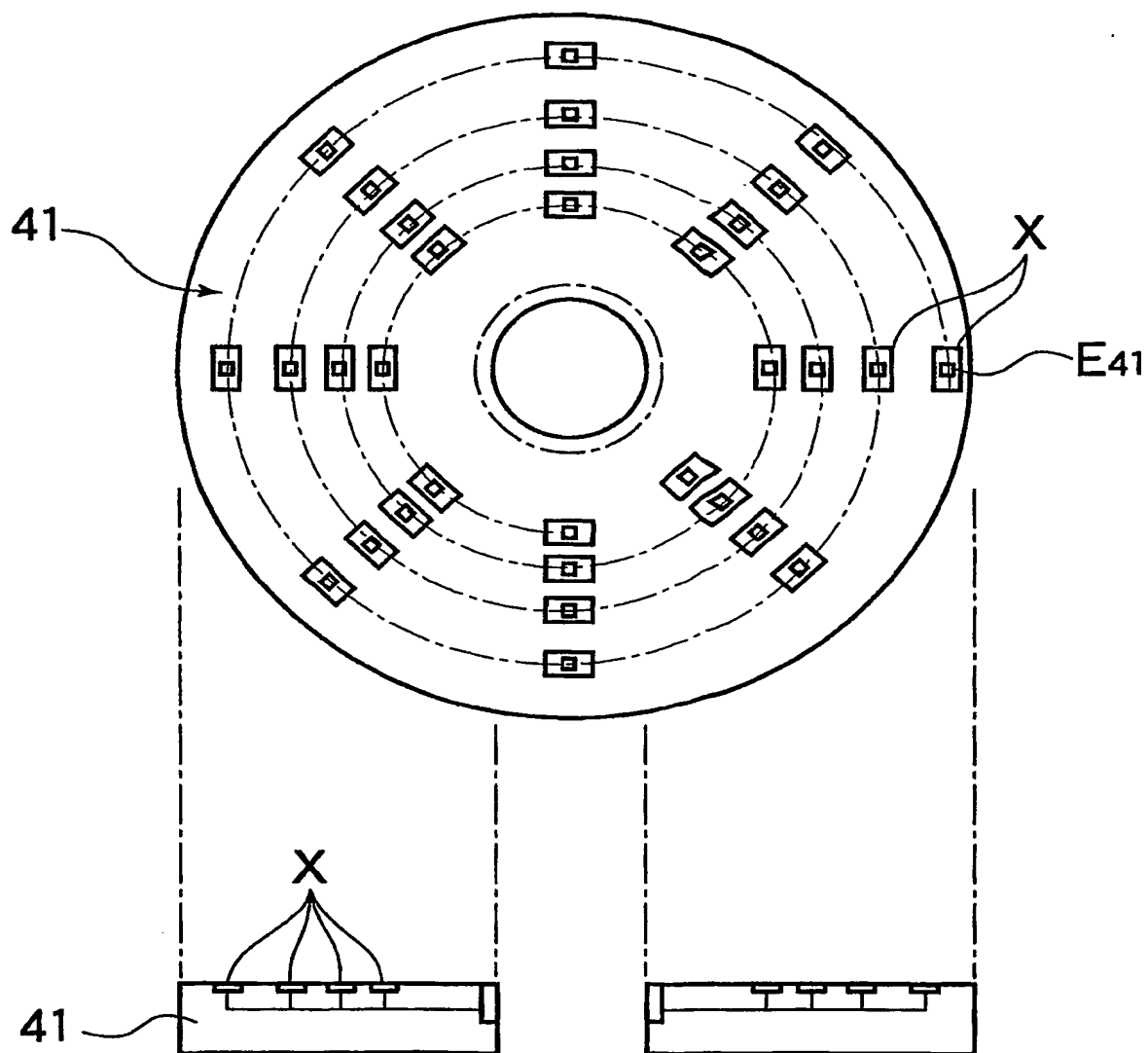


Fig.8

9/13

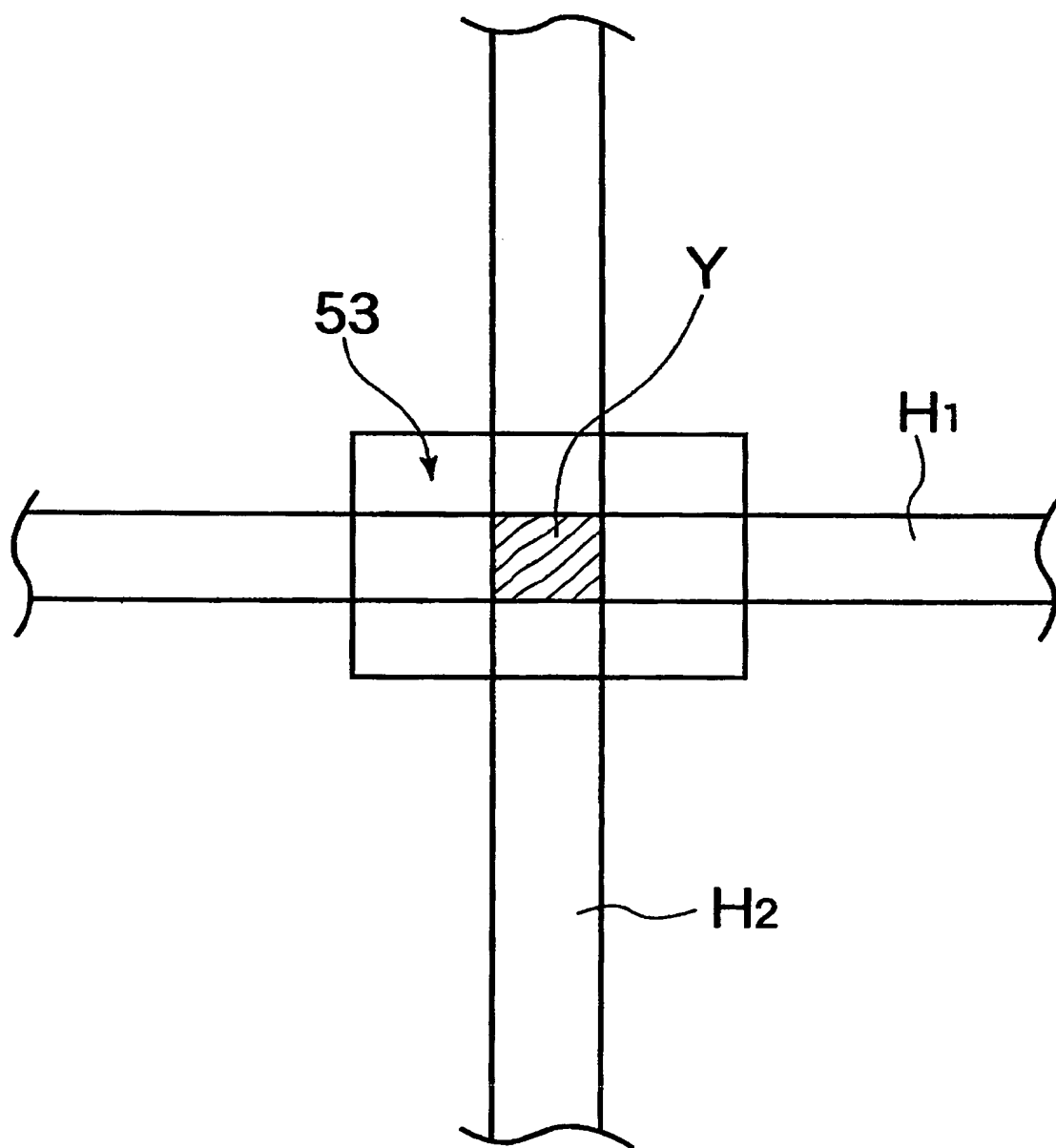


Fig.9

10/13

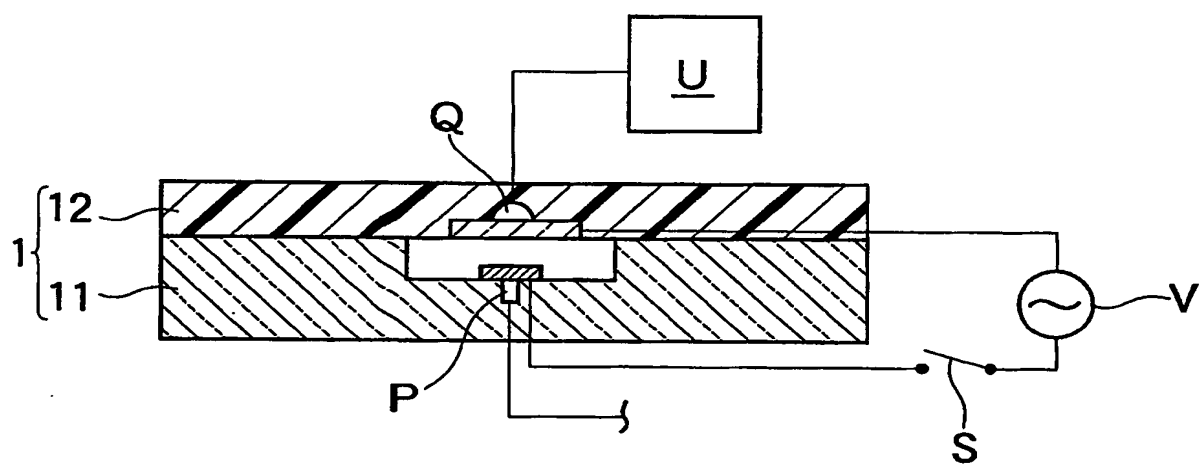


Fig.10

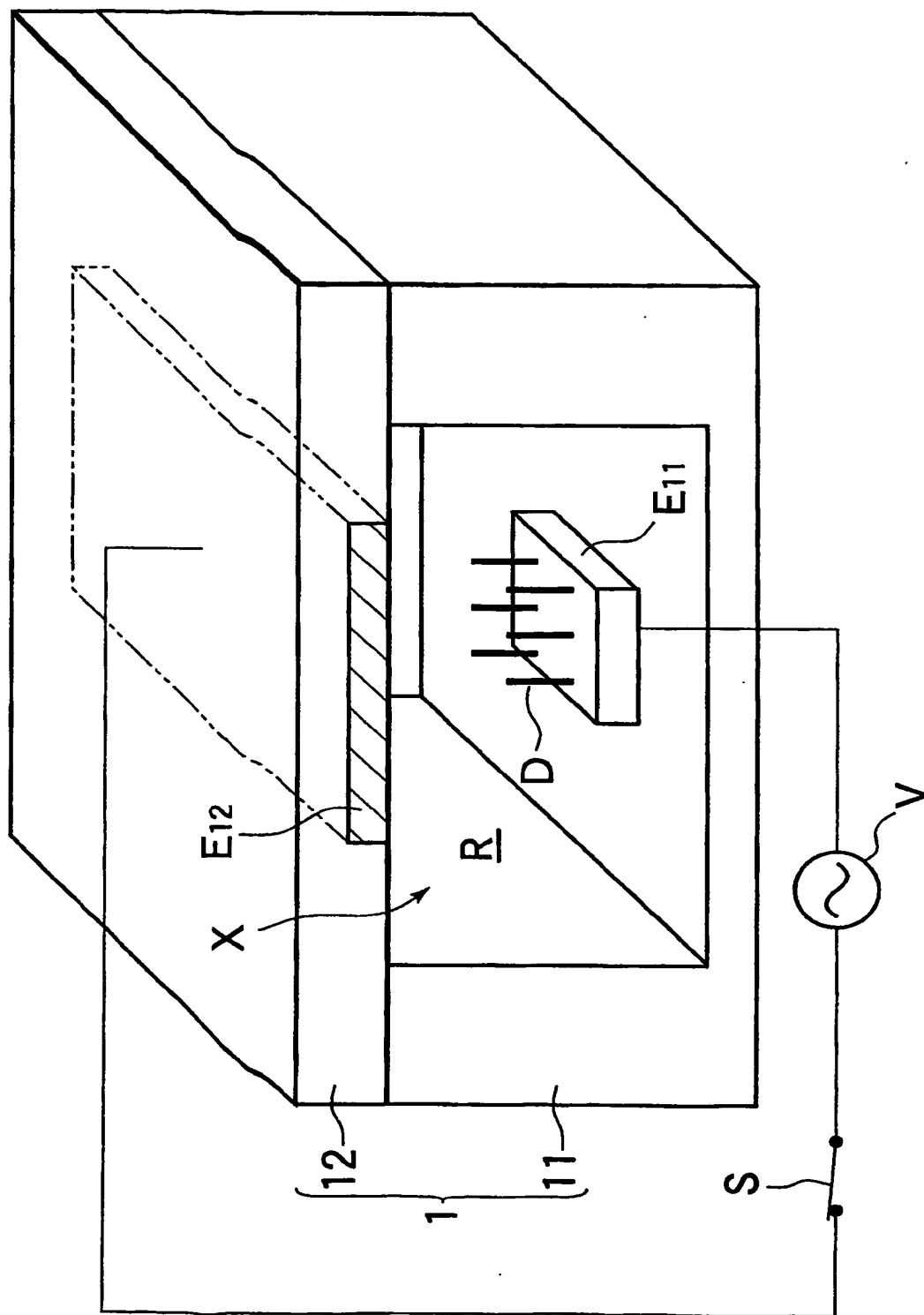


Fig.11

12/13

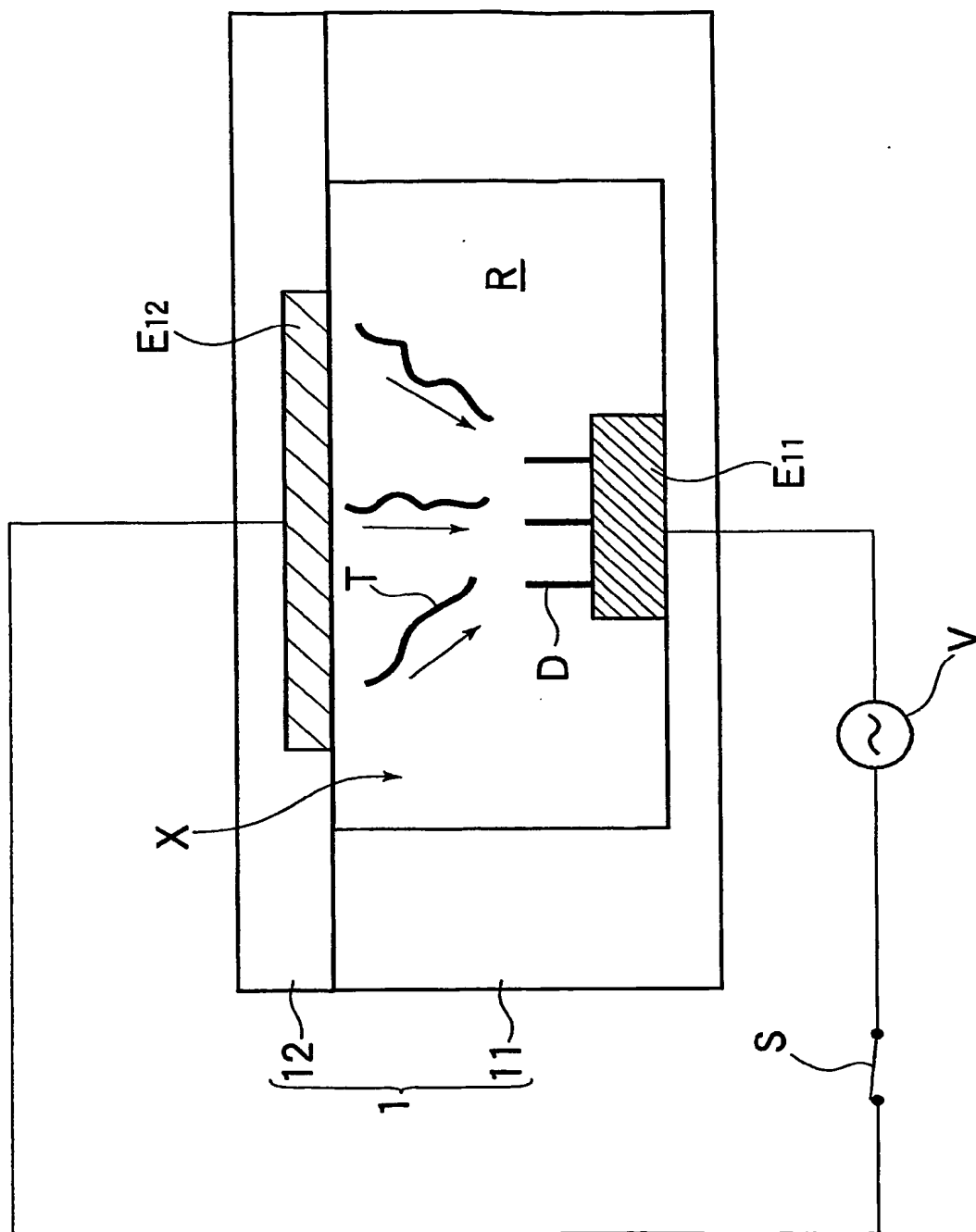


Fig.12

13/13

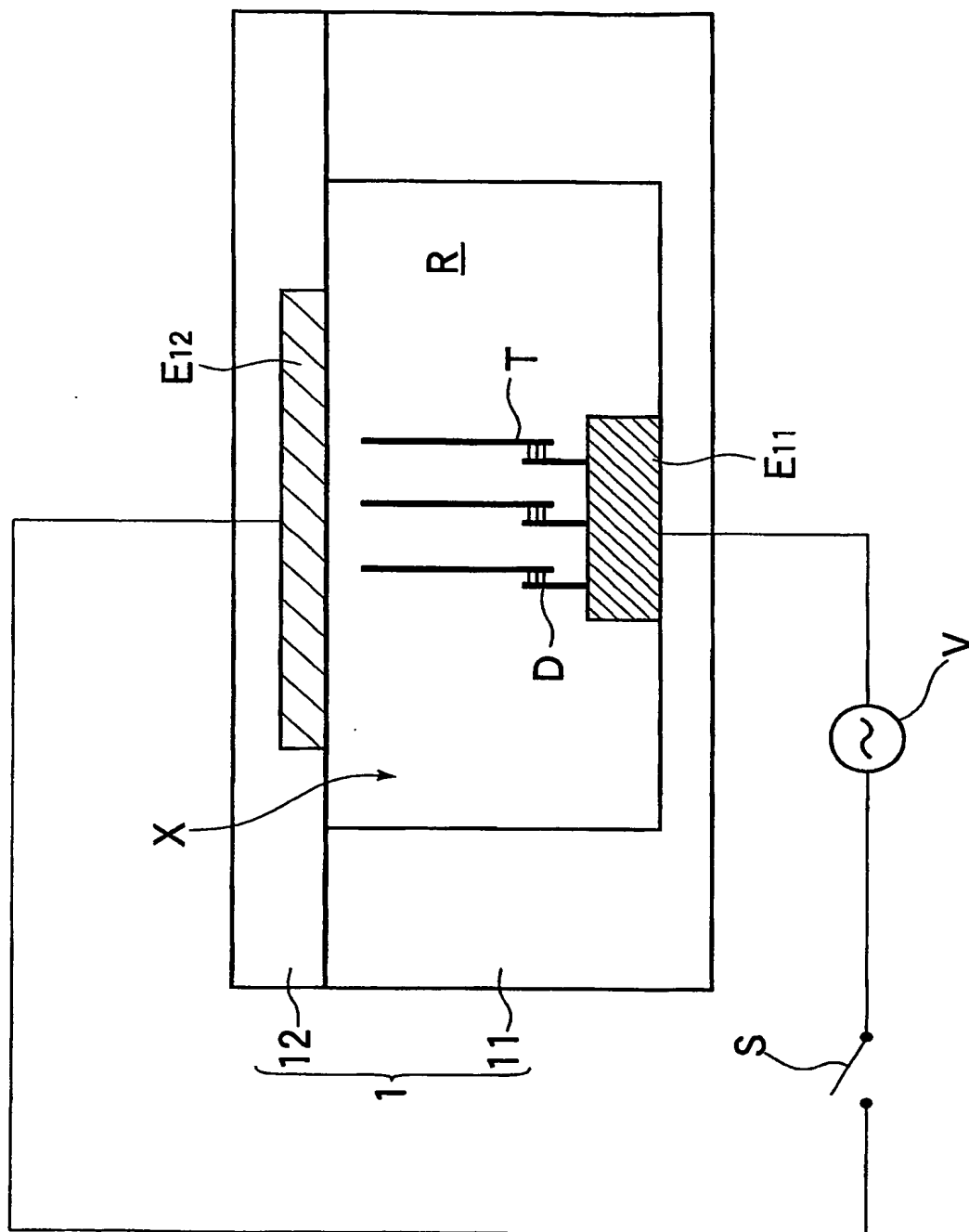


Fig.13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 02/66969 A (Kyowa Medex Co., Ltd.), 29 August, 2002 (29.08.02), & AU 2002232185 A	1, 2, 5, 6, 10 3, 4, 7-9
Y	JP 2002-85095 A (Yokogawa Electric Corp.), 26 March, 2002 (26.03.02), & US 2002/0028502 A & EP 1186670 A	3, 4
Y	JP 2003-155300 A (Protein Crystal Co., Ltd.), 27 May, 2003 (27.05.03), (Family: none)	3, 4
Y	JP 11-94747 A (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.), 09 April, 1999 (09.04.99), (Family: none)	7-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 November, 2004 (18.11.04)

Date of mailing of the international search report
07 December, 2004 (07.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/53 G01N 37/00 C12M 1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/53 G01N 37/00 C12M 1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 02/66969 A(協和メデックス株式会社)2002. 08. 29 & AU 2002232185 A	1, 2, 5, 6, 10 3, 4, 7-9
Y	JP 2002- 85095 A(横河電機株式会社)2002. 03. 26 & US 2002/0028502 A & EP 1186670 A	3, 4
Y	JP 2003-155300 A(株式会社プロテインクリスタル)2003. 05. 27 (ファミリー無し)	3, 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 11. 2004

国際調査報告の発送日

07.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

2 J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 11- 94747 A(日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社) 1999. 04. 09 (ファミリー無し)	7-9